



AVALIAÇÃO PRÉVIA *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-*Pythium insidiosum* E CITOTOXIDADE DE MEFENOXAM¹

Aline Fontanella Maciel², Lara Baccarin Ianiski³, Ana Carolina Nolasco Colla⁴, Daniela Isabel Brayer Pereira⁵, Janio Morais Santurio⁶, Sônia de Avila Botton⁷

¹Projeto de pesquisa desenvolvido na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, Brasil;

²Estudante do curso de Farmácia UFSM; Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Tecnológica e Inovação (PIBITI/FAPERGS); Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM); E-mail: alinemacielufsm@gmail.com

³Farmacêutica; Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas UFSM; Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM); E-mail: larabaccarin@gmail.com

⁴Estudante do curso de Medicina Veterinária UFSM; Bolsista do Programa Institucional de Pesquisa (PROBIC/FAPERGS); Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM) E-mail: anacarolinacolla@gmail.com

⁵Médica Veterinária; Professora na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Instituto de Biologia, Pelotas, RS, Brasil; E-mail: danielabrayer@gmail.com

⁶Médico Veterinário; Professor na UFSM, Departamento de Microbiologia e Parasitologia; Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM); E-mail: janio.santurio@gmail.com

⁷Médica Veterinária; Professora na UFSM, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva; Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM); E-mail: sabott20@gmail.com

Introdução: *Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático e principal agente etiológico da pitiose. Esta enfermidade granulomatosa crônica, geralmente fatal, pode acometer humanos e animais e há registros em áreas tropicais, subtropicais e temperadas, predominantemente em regiões alagadiças. No Brasil, os casos de pitiose são descritos principalmente em equinos; contudo, há relatos em diferentes espécies de animais e no homem. Não há um protocolo de tratamento totalmente efetivo para a doença, desse modo utiliza-se combinação de terapias, as quais incluem tratamento químico, cirúrgico e imunoterapia. Atualmente, a busca por novas alternativas de tratamento da pitiose tem impulsionado pesquisas com novos compostos e fármacos reposicionados. O mefenoxam é um fungicida normalmente empregado em tratamentos agrícolas e tem ação sobre fitopatógenos como fungos e oomicetos. **Objetivos:** Avaliar a atividade anti-*P. insidiosum* e a citotoxicidade *in vitro* do fitoantifúngico mefenoxam. **Metodologia:** Para o teste de suscetibilidade foram utilizados previamente 10 isolados de *P. insidiosum*, todos identificados morfofisiologicamente e por técnicas moleculares. Os isolados foram cultivados em *corn meal agar* e posteriormente repicados para placas de Petri contendo ágar V8 e incubadas a 37°C/48h, após foram acrescentados fragmentos de grama (*Paspalum notatum*) autoclavados, e as placas novamente incubadas a 37°C/48h. Após, os fragmentos de grama parasitados pelo oomiceto foram transferidos para placas de Petri contendo meio de indução e incubados a 37°C/24h. Posteriormente, as placas de Petri foram rotacionadas a 3.000 rpm/5 min e procedeu-se a contagem de zoósporos livres no meio de indução, utilizando-se câmara de Neubauer e observada em microscopia ótica. A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada de acordo com o protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Para determinar as CIM₀ (100% de inibição do crescimento), CIM₁ (≥90% e <100% de inibição do crescimento) e CIM₂ (inibição do crescimento ≥50% e <90%), foram visualizados o crescimento ou inibição de crescimento



micelial frente a diferentes concentrações do antifúngico. A concentração oomicida mínima (COM), é baseada nas CIM_0 de cada isolado. O mefenoxam foi avaliado nas concentrações de 0,039 a 20 $\mu\text{g/mL}$. Para avaliação da toxicidade *in vitro*, a linhagem celular de fibroblastos de camundongos (BALB/c 3T3) foi cultivada em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO™) e incubada a 37°C/24h, em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 . Após o período, as células viáveis foram verificadas e padronizadas (3×10^4 células/poço). A avaliação dos compostos nas diferentes concentrações: 1, 5, 15, 30 e 50 $\mu\text{g/mL}$, foi realizada e em triplicata, juntamente com o controle positivo (linhagem celular) e controle negativo (DMSO). Após exposição por 24h e 72h, foi adicionado o corante brometo 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT) e realizada a leitura em leitor de placa de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) na faixa de leitura de 570 nm e, assim, as densidades ópticas foram convertidas em percentual de viabilidade celular. **Resultados:** Em relação a CIM_0 , o mefenoxam inibiu o crescimento micelial em concentrações de 0,625 a 10 $\mu\text{g/mL}$. A COM apresentou concentrações de 1,250 a 20 $\mu\text{g/mL}$ para o mefenoxam. Em relação a análise de toxicidade *in vitro* do mefenoxam, não houve redução da viabilidade celular significativamente nas doses menores que 50 $\mu\text{g/mL}$, em ambos períodos de exposição, porém houve diminuição da viabilidade nas células expostas por 72h em comparação por 24h. **Conclusões:** O mefenoxam possui ação inibitória contra *P. insidiosum in vitro* frente aos isolados testados. A ação ocorreu em doses que não apresentaram toxicidade através da técnica do MTT. Contudo, estudos adicionais devem ser realizados, afim de, utilizar um maior número de linhagens celulares e em diferentes técnicas de avaliação. **Palavras-chave:** Pitiose; Fitoantifúngicos; Suscetibilidade. **Agradecimentos:** À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), ao Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI/UFSM) e agências de fomento à pesquisa: FAPERGS, CNPq e CAPES (código financeiro 001).